

· 综述 ·

MicroRNA 与头颈部肿瘤

胡 安 综述, 金晓杰 审核

(上海交通大学医学院附属仁济医院 耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200001)

关 键 词: 微小核糖核酸; 头颈部肿瘤; 基因芯片

中图分类号: R739.91

文献标识码: C

文章编号: 1007-1520(2010)01-0073-04

MicroRNA (miRNA) 是一类非编码的小 RNA 分子, 在哺乳动物中表达非常丰富, 对基因的翻译后调节有重要作用。microRNA 在肿瘤细胞的发生与发展过程中起到多种作用, 包括影响肿瘤细胞的分化, 凋亡和增殖等。研究表明 20%—30% 的人类基因都受到 microRNA 的调控^[1-2], 目前已经得到精确验证的 microRNA 有 400 多种^[3], 约为人类编码蛋白基因数量的 1%—2%, 还有大量预测的 microRNA 基因需要通过实验验证。近年来, microRNA 在头颈肿瘤中正逐渐得到广泛的研究, 本文对这一方面的研究成果作简要综述。

1 MicroRNA 的作用方式及在肿瘤学中的研究

MicroRNA 的作用方式分为两种^[3], 一种是与靶 mRNA 完全互补结合, 这种结合方式会引起靶 mRNA 的降解。第二种作用方式是与目标 mRNA 不完全的结合, miRNA 与靶 mRNA 结合时能暂时中断 mRNA 翻译成蛋白质, 在一定条件下能释放, mRNA 又能翻译蛋白质。后者是 microRNA 的主要调节方式, miRNA 可作为翻译的开关, 抑制翻译而又不破坏转录产物, 这是一种较好调节基因表达的途径。发夹状 pre-miRNA 与靶基因不完全互补, 存在错配, 因此对 mRNA 的影响非常广泛, 可以对多个 mRNA 同时起作用。因其对靶

RNA 的特异性相对较低, 一个突变不影响 miRNA 的作用效应。

有研究表明, microRNA 表达的增加或减少对肿瘤的产生与肿瘤的生物行为有重要的作用^[4]。在一些特定的肿瘤中, microRNA 可以作为一种独特的标记。有研究证实^[5], 在膀胱癌中下调表达的 7 种 miRNA 能够很好的将膀胱癌病例与非膀胱癌病例区分开, 有鉴别诊断作用。在恶性胶质瘤、胰腺癌和乳腺癌中^[6-8], 发现存在与肿瘤发生相关的 microRNA, 在肿瘤形成过程中起到癌基因的作用。在慢性淋巴细胞性白血病的研究中还发现, mir-34a 能直接受 p53 的调节并影响 Bcl-2 的表达^[9]。

2 头颈部肿瘤 microRNA 的研究方法

MicroRNA 最早由 Lee 等^[10]于 1993 年发现, 该作者于 2006 年获得 Nobel 奖。Lee 等人用经典的定位克隆的方法在线虫 (*C. elegans*) 中克隆 lin-4 基因, 并通过定点突变发现 lin-4 并不编码蛋白, 而是产生小的 RNA 分子。这种小 RNA 分子能以不完全互补的方式与其对应靶 mRNA 的 3' 非翻译端特定区域相互作用来抑制 lin-14 的表达, 最终导致 lin-14 蛋白质合成的减少。microRNA 通过和靶基因 mRNA 碱基非特异性的结合引导沉默复合体 (RISC) 抑制 mRNA 的翻译或降解 mRNA, 从而在转录后水平调控蛋白的表达。这种 microRNA 在物种进化中非常保守, 在动物、植物和真菌等中发现的 microRNA 表达均有严格的组织特

作者简介: 胡 安, 男, 硕士研究生。

通讯作者: 金晓杰, Email: jinxiaojie007@yahoo.com.

异性和时序性。

头颈部肿瘤的标本较难获得,研究中可用到实体肿瘤的标本与传代的肿瘤细胞系。检测 microRNA 的方法有多种,RT-PCR 方法是目前检测基因表达最灵敏和可靠的方法,但 microRNA 分子太小,不能采用常规的 RT-PCR 检测,需要进行特殊的设计。有的实验室采用改良的定向克隆方法来筛选具有相同特征的 RNA 分子,连接到 3' 和 5' 的适配子(adapters),逆转录并通过 PCR 扩增、亚克隆并测序。miRNA 前体在基因组上的定位和聚类是通过向基因组数据库查询进行。这个方法有助于判断 miRNAs 是否是 mRNAs、tRNAs、rRNAs 等分子的降解产物。Tran 等^[11]对头颈部肿瘤细胞系中的成熟 miRNA 进行低聚核苷酸芯片检测,发现有 33 种 miRNA 高表达,22 种 miRNA 低表达,其中 mir-21 和 mir-205 显著高表达。并且在随后的 Northern blot 分析中得到了证实。Raymond 等^[12]在实验中用引物延伸的方法对引物进行反转录来检测感兴趣的 microRNA,这一方法在从 RNA 到 cDNA 的反转录过程中实现引物延伸的定量检测。Chen 等^[13]则认为,采用茎环反转录引物来进行反转录试验具有更好的敏感性与特异性,这种高敏感性的试验方法可以对单个细胞进行检测。Castoldi 等^[14]在实验中使用改进的 microarray 方法来对 microRNA 进行检测,实现了对大量 microRNA 的快速检测。作者在实验中使用了一种新的 microarray 平台,该方法针对锁定核酸改良所使用的探针,可灵敏的检测到单个核苷酸的差别。

3 MicroRNA 研究在头颈肿瘤方面的进展

Sengupta 等^[15]对 31 例鼻咽癌组织中 microRNA 的表达情况进行了研究,发现 mir-29c 的表达水平下调,表达量只有正常鼻咽黏膜中 mir-29c 的 1/5。研究者在鼻咽癌肿瘤中观察到,与 mir-29c 具有 3' 端非编码区结合位点的 mRNA 水平则相应的上调,而该 mRNA 参与编码多种细胞外基质成份的表达。Shintani Y 等^[16]的研究表明,细胞外胶原和层粘连蛋白水平的增加可

以诱导肿瘤细胞侵袭力与转移能力的增加。由此研究者认为 mir-29c 表达量的下调可能与增加鼻咽癌细胞的侵袭与转移能力有关。有学者^[17]以 microRNA 芯片为平台初步研究了鼻咽癌 microRNA 的表达谱,发现在原代培养的鼻咽癌细胞与正常鼻咽上皮细胞之间存在 24 个差异表达的 microRNA,其中 18 个 microRNA 在鼻咽癌中表达下调,6 个 microRNA 在鼻咽癌中表达上调。在鼻咽癌表达下调 2 倍以上的有:mir-203、mir-503、mir-424、mir-141 和 mir-148a 共 5 个;在鼻咽癌中表达上调 2 倍以上的有:mir-25、mir-195 和 mir-15a 共 3 个。研究者运用靶基因预测软件并结合全基因组表达谱芯片结果预测差异表达 miRNAs 可能调控的靶基因,其中 mir-203 的预测靶基因为 CCNG1 和 SPARC,Western blot 研究结果表明 SPARC 和 CCNG1 在鼻咽癌细胞中表达增高,显示 SPARC 和 CCNG1 有可能是 mir-203 的靶基因之一。但 mir-203 调控这两种基因的具体机制还未得到证实,研究者认为 microRNA 可能是与靶 mRNA 形成不完全互补双链来阻遏 SPARC 和 CCNG1 的翻译过程。

Chang 等^[18]研究了头颈鳞状细胞癌 microRNA 表达的特点,检测了人类头颈鳞状细胞癌 microRNA 的表达情况。研究发现 9 种 microRNA 表达量发生了改变,上调的有 mir-21, let-7, mir-18, mir-29c, mir-142-3p, mir-155, mir-146b, 以及下调表达的 mir-494。作者对 mir-21 与 mir-494 进行 qRT-PCR 的验证,结果表明 mir-21 在肿瘤组织中表达量较正常组织明显增高,而 mir-494 表达的下调没有得到有效证实。作者对 mir-21 在头颈肿瘤中的作用做了进一步的研究,发现 mir-21 的调节功能可能与细胞的凋亡途径有关。在实验中敲除 mir-21 可引起细胞色素 C 的释放减少,从而引起细胞凋亡的增加。但这种增加幅度并不显著,说明 mir-21 可能并不是一个主要的抑癌基因。mir-21 是否直接或间接的引起了细胞色素 C 的释放及其后引发的凋亡还需要进一步的确定。有学者^[19]对 mir-21 的作用机制做了进一步的研究,发

现在程序性细胞死亡4基因(PDCD4)的3'端非编码区存在一个mir-21调节靶位点。研究者对PDCD4下游的3'端非编码区进行了克隆表达,可以观测到mir-21下调表达。而加入了mir-21的反义RNA后观察到PDCD4的上调。随后的研究发现,PDCD4基因3'端非编码区结合位点的缺失或者突变后,mir-21则无法调节其表达。这表明PDCD4下游的3'端非编码区存在一个mir-21的关键调节区域。Hebert等^[20]对口腔鳞状细胞癌细胞系进行microarray分析,发现有47种microRNA的表达增多,其中miRNA-98的增多最为明显,有4.5倍的增加,并采用qRT-PCR的方法进行了验证。作者对mir-98与其可能靶目标高迁移率族蛋白A2(HMGA2)的关系做了进一步的研究,发现HMGA2在头颈部肿瘤中的表达受到mir-98的部分调节。HMGA2的表达与细胞微环境中氧含量有关,其表达受到mir-98和其它一些miRNA的直接调节。本研究显示在正常氧含量的情况下转染mir-98的前体能减少HMGA2的表达并能增加细胞对阿霉素、顺铂的耐受性。这一实验结果表明miRNA在肿瘤适应不同微环境的过程中起着重要作用。

George等^[21]对甲状腺肿瘤中microRNA的表达情况进行了芯片研究,发现mir-187, mir-221, mir-222, mir-181b, mir-146b, mir-155, and mir-224的表达量显著高于对照组的正常甲状腺组织。随后研究者对62例甲状腺肿瘤组织进行了细针抽吸样本的microRNA验证实验。这62例病例中有13例患者按照细针抽吸样本的病理结果进行了甲状腺手术,包括8例为恶性肿瘤,5例为增生结节。对这13例手术患者的细针抽吸样本进行检测后发现,上述microRNA中至少一种的表达量出现了2倍以上的上调。在其余的49例没有进行甲状腺手术的病例中,只有2例出现了1种上述microRNA的上调,1例出现了3种microRNA(mir-221, mir-222, mir-146b)的明显上调,其余46例没有出现上述任何一种microRNA表达量的上调。由此,研究者认为细针抽吸样本的microRNA检查可以初

步的区分甲状腺肿瘤的病例,microRNA在甲状腺肿瘤中的表达谱有可能成为早期甲状腺癌诊断的有效途径,可利用上述的microRNA的表达谱来对甲状腺癌的早期病例进行筛选。Visone^[22]在研究中发现,mir-221并不仅仅在甲状腺乳头状癌组织中过表达,在正常甲状腺组织中也观察到了高表达的情况。研究者在15例正常甲状腺组织中,发现有3例出现了mir-221的高表达。这一有趣的现象表明,在与肿瘤组织相临的正常甲状腺组织中可能隐藏有基因的改变,但还没有表现为形态学上的肿瘤。mir-221的过表达可能是甲状腺乳头状癌的一种分子水平上的癌前病变。因此,miRNA的改变有可能是甲状腺乳头状癌发生与发展的关键信号。由此作者认为,mir-221在甲状腺组织中可能作为一种致癌基因存在。Visone^[23]在研究甲状腺乳头状癌中发现,过表达的mir-221, mir-222能调节p27Kip1蛋白的表达水平。这些miRNA与p27Kip1基因的3'端非编码区有相匹配的序列,可调节p27Kip1 mRNA的翻译,改变p27Kip1蛋白的表达水平。作者在研究中观察到mir-221, mir-222的高表达显著引起了p27Kip1蛋白水平的增加,但p27Kip1 mRNA水平并没有发现明显的改变,这证实了mir-221, mir-222对p27Kip1的调节发生在转录后的水平。

4 MicroRNA在头颈部肿瘤中应用的展望

microRNA在物种之间的表达相当保守,并且在转录后水平调节基因的表达,这已引起了广大学者的关注,microRNA成为当前头颈外科肿瘤的研究热点。microRNA表达方式的不同,与头颈部肿瘤的物质代谢、细胞分化、凋亡、侵袭与转移都紧密相关。在头颈部肿瘤中有哪些microRNA具有肿瘤的特异性,是否能够作为检测肿瘤的标志物还有待进一步的研究。microRNA与肿瘤的临床分型分期及病人的预后是否有一定的关系还需要由大样本的临床资料来证实。在头颈部肿瘤细胞中还有大量的非编码microRNA有待发现,大多数已发现

microRNA 的靶基因及其调控的蛋白还有待进一步去探索。microRNA 在肿瘤发生发展过程中所起的作用还需要进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] Xie X, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals[J]. *Nature*, 2005, 434(7031): 338—345.
- [2] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15—20.
- [3] Ruby JG, Stark A, Johnston, et al. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs[J]. *Genome Res*, 2007, 17(12): 1850—1864.
- [4] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. *NatRev Cancer*, 2006, 6(11): 857—866.
- [5] Ichimi T, Enokida II, Okuno Y, et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2009, 125(2): 345—352.
- [6] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS, et al. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6029—6033.
- [7] Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al. Expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(29): 4677—4684.
- [8] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7065—7070.
- [9] Mraz M, Pospisilova S, Malinova K, et al. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes[J]. *Leukemia and Lymphoma*, 2009, 50(3): 506—509.
- [10] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with anti-sense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843—854.
- [11] Tran N, McLean T, Zhang X, et al. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 358(1): 12—17.
- [12] Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engele P, et al. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs[J]. *RNA*, 2005, 11(11): 1737—1744.
- [13] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- [14] Castoldi M, Schmidt S, Benes V, et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA)[J]. *RNA*, 2006, 12(5): 913—920.
- [15] Sengupta S, Den Boon JA, Chen IH, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 105(15): 5874—5878.
- [16] Shintani Y, Hollingsworth MA, Wheelock MJ, et al. Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11745—11753.
- [17] LI Xiaoxia, LI Rui-ping, DU Ziming. Identification of differentially expressed microRNAs in nasopharyngeal carcinoma[J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2007, 28(6): 607—612.
- [18] Chang SS, Wei WJ, Califano JA, et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Int. J. Cancer*, 2008, 123(12): 2791—2797.
- [19] Lu Z, Liu M, Stribinskis V, et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene[J]. *Oncogene*, 2008, 27(31): 4373—4379.
- [20] Hebert C, Norris K, Scheper MA, et al. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2007, 14(6): 5.
- [21] Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, et al. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(5): 1600—1608.
- [22] Pallante P, Visone R, Ferracin M, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas[J]. *Endocr.-Relat. Cancer*, 2006, 13(2): 497—508.
- [23] Visone R, Russo L, Pallante P, et al. MicroRNAs (miR)-221 and mir-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr.-Relat*[J]. *Cancer*, 2007, 14(3): 791—798.

(修回日期:2009-08-28)